高效构建卵清白蛋白 scFv 噬菌体文库及其筛选*

郎巧利，余琳，何麒麟，葛良鹏**，杨希**

（重庆市畜牧科学院，农业部养猪科学重点实验室，养猪科学重庆市市级重点实验室，重庆市医用动物资源的开发与利用工程计算研究中心，重庆 402460）

摘要 目的：建立一种高效噬菌体文库构建方法，获得抗鸡卵清蛋白（ovalbumin, OVA）的单链抗体（scFv）噬菌体展示文库，筛选鉴定获得 OVA 单链抗体。方法：用 OVA 蛋白免疫 Balb/C 小鼠，选取血清抗体效价高的小鼠提取脾脏 RNA，利用 RT-PCR 方法扩增获得小鼠重链和小鼠轻链基因。通过无缝连接酶一步将小鼠重链基因、轻链基因和 linker DNA 连接起来，插入噬菌体表达载体中，构建 OVA scFv 噬菌体展示文库。测定文库容量，对文库进行富集筛选，ELISA 鉴定阳性克隆，测序后构建真核表达载体，转入 Expi-CHO 悬浮细胞进行真核表达，利用 Western blot 进行鉴定。结果：成功获得库容量为 1.2×10^7cfu 的 OVA scFv 噬菌体展示文库，并从中筛选出 8 个阳性克隆，选取效价最高的 2 号克隆，在 Expi-CHO 悬浮细胞中表达获得可溶性抗体。结论：本研究建立了一种高效构建 scFv 噬菌体文库的方法，筛选获得高结合活性的 OVA 单链抗体，并成功进行了真核表达，为 OVA ELISA 检测试剂盒的研制奠定了基础。

关键词：鸡卵清蛋白；scFv；噬菌体展示；真核表达

Construction and Screening of a Phage Display Library of Single Chain Fv Antibody Efficiently from Mouse Immunized with ovalbumin

LANG Qiao-li, YU Lin, He Qi-lin, Ge Liang-peng, Yang Xi

(Chongqing Academy of Animal Sciences, Key Laboratory of Pig Industry Sciences, Chongqing research center for the development and utilization of medical animal resources, Chongqing, 402460, China)

Abstract Objective: to establish an efficient method for construction of a Phage Display Library of Single Chain Fv (scFv) Antibody Efficiently from Mouse Immunized with ovalbumin (OVA) and obtain anti-OVA single chain antibody. Methods: Balb/C mice were immunized with OVA. The heavy chain and light chain variable region gene of immunoglobulin were amplified from mRNA of spleen cells of mice with high serum OVA antibody titer by RT-PCR and joined by a DNA linker with Seamless Cloning. These fragments were inserted into phage expression vector to construct a phage display library. After measurement of library capacity, affinity selection and ELISA analysis were run to find high affinity scFv. Its protein was expressed by Epxi-CHO cells and identified by western blot analysis. Results: The OVA scFv phage display library was constructed and its library capacity was 1.2×10^7 cfu. Eight high affinity scFv were screened from this library. The 2# clone with the highest affinity was cloned into the eukaryotic expression vector and expressed in expi-CHO cells. The western blot analysis showed that it is a soluble

*重庆市科研院所绩效激励引导专项（cqjxjl201709）；重庆市农发资金资助项目(17406)；国家自然科学基金（5167070727）；

**杨希和葛良鹏为共同通讯作者，杨希电子邮箱：406162197@qq.com，葛良鹏电子信箱：geliangpeng1982@163.com

antibody . Conclusion: This study established a highly efficient method for construction of a scFv phage library and generated a high affinity OVA scFv antibody. These laid a good foundation for the development of the research of OVA ELISA analysis kit.

Key words: Ovalbumin (OVA); Single Chain Fv (scFv) Antibody; Phage Display; Eukaryotic Expression

抗体是是进行临床医学、分子生物学和药学研究的重要工具之一[1]。抗体制备技术经过了三个阶段的发展，分别是多克隆抗体阶段、单克隆抗体阶段和基因工程抗体阶段。其中单链抗体（single chain antibody fragment， scFv）是基因工程抗体的代表，是保留抗体活性的最小结构单位，由抗体重链可变区通过短肽和抗体轻链可变区连接而成。相较于完整的抗体，它具有抗原性弱、穿透力强、分子量小，便于基因工程操作，基本保留对抗原的亲和活性等优点[2]。噬菌体展示技术，是利用 PCR 扩增抗体的的可变区基因，将此可变区基因与噬菌体外壳蛋白基因连接，然后以融合蛋白的方式展示到噬菌体的表面，从而实现基因的克隆化。该技术现已是一种应用十分广泛的蛋白和多肽筛选技术，常用于微生物诊断和治疗、表位标记和筛选、生物医药和抗体工艺的开发等领域[3- 6]。鸡卵清蛋白（ovalbumin, OVA）是鸡卵蛋白的主要蛋白质，分子量约 44.5kD[7,8]，属于大分子蛋白，微量便可能引起过敏反应，是流感疫苗接种反应的检测指标，也可作为鸡蛋过敏原的一个检测指标。目前国内有针对流感疫苗的卵清蛋白 ELISA 检测试剂盒，但其特异性、灵敏度和准确性都比国外 ELISA 检测试剂盒差。而国内食品中卵清蛋白 ELISA 检测试剂盒几乎没有，基本依赖进口。本研究旨在利用噬菌体展示技术构建 scFv 抗体文库，并筛选出抗 OVA 的单链抗体，进行真核表达，为 OVA 的 ELISA 检测试剂盒的研制奠定基础。

1 材料与方法

1.1 材 料

1.1.1 实验动物及抗原

4~6 周龄雄性 Balb/C 小鼠购自成都达硕实验动物有限公司，OVA 购自 sigma。

1.1.2 质粒、噬菌体及菌种

噬菌粒载体 pCANTAB5e、辅助噬菌体 M13K07、融合表达宿主菌 TG1 均购自北京宝科维食安生物技术有限公司。

1.1.3 主要试剂

SV Total RNA Isolation System 购自 promega 公司；RevertAid First Strand cDNA Synthesis Kit 购自 Thermo Scientific；凝胶回收试剂盒购自 qiagen 公司；质粒提取试剂盒购自全式金公司；In-Fusion HD Cloning kits、T4 连接酶、Taq DNA 聚合酶、DNA 限制性内切酶、DNA Marker 均购自 TaKaRa 公司；HRP 标记鼠源抗 M13 单克隆抗体购自 GE 公司；HRP 标记的羊抗鼠 IgG 抗体、抗 His 标签的鼠单抗均购自 abcam 公司；Expi-cho 表达系统、抗鼠 IgG（H+L）的荧光二抗均购自 invitrogen。胰蛋白胨(Tryptone) 和酵母提取物(Yeast extract)购自

OXOID；SOB、2×YT 培养基按照《分子克隆》配制，各培养中中含葡萄糖（Glucose，G）的浓度为 100mmol/L，氨苄青霉素（Amplicillin，A）浓度为 100μg/ml，卡那霉素（Kanamycin，K）为 50μg/ml。

1.2 方 法

1.2.1 动物免疫

选取 6 周龄的 Balb/C 雄性小鼠，免疫 OVA 蛋白 200μg/只/次，免疫 4 次，每次间隔两周，设置注射 PBS 缓冲液的阴性小鼠，首次免疫使用弗氏完全佐剂皮下注射，加强免疫使用弗氏不完全佐剂进行腹腔注射。

1.2.2 ELISA 检测小鼠血清效价

取第四次免疫两周后小鼠的尾静脉血，3000rpm 离心 20min，吸出上清即血清用于 ELISA 抗体效价检测。用包被液稀释 OVA（2μg/ml），取 100μL/孔加入 96 孔板中，4℃过夜。将包被好的 96 孔板用洗涤液洗 3 次后，加入 1%BSA 封闭 2h。再用洗涤液洗 3 次后加入稀释好的免疫后小鼠血清（1：400，1：800，1：1600，1：3200，1：6400，1：12800，1:25600），同时以未免疫的小鼠血清作为阴性对照，37℃孵育 1h。用洗涤液洗 3 次后再加入 HRP 标记的羊抗鼠 IgG 抗体（1：5000 稀释），37℃孵育 1h。用洗涤液洗 3 次后加入基联苯胺（TMB）显色 15min，再加入终止液，后用酶标仪检测波长 450nm 处的吸光值。

1.2.3 提取小鼠脾脏总 RNA 及 RT-PCR

取 3 只血清效价高于 1：10000 的免疫小鼠，分离脾淋巴细胞，按 RNA 提取试剂盒说明书提取脾脏总 RNA。利用反转录试剂盒，以 Oligo (dT)18 Primer 和随机引物为引物进行反转录，获得 cDNA。

1.2.4 PCR 克隆 VH 和 Vκ基因

设计 VH 和 Vκ兼并引物以及 linker 并在两端加上酶切位点和同源臂，引物和 linker 设计如表 1。

表 1 引物序列表

Table1 List of primers

Name	Sequence
VH-For	GGCCAGCCGGCC[1)]ATGGCCCAGGTSMARCTGCAGSAGTCWGG
VH-Rev	**TCCACCTGAGGAGA**[2)]CGGTGACCGTGGTCCCTTGGCCCC
Linker	**GTCTCCTCAGGTGGA**GGCGGTTCAGGCGGAGGTGGCTCTGGCGGTGGCGGA**TCGGACATCGAGCTC**
Vκ-For	**TCGGACATCGAGCTC**GACATTGAGCTCACCCAGTCTCCA
Vκ1-Rev	GCGGCGCCCGTTTGATTTCCAGCTTGGTGCC
Vκ2-Rev	GCGGCGCCCGTTTTATTTCCAGCTTGGTCCC
Vκ4-Rev	GCGGCGCCCGTTTTATTTCCAACTTTGTCCC

Vκ5 - Rev	GCGGCGCCCGTTTCAGCTCCAGCTTGGTCCC

Note：1):Underline represent restriction endonucleases cleavage sites;2): Bold represent Homology arm

以 cDNA 为模板，利用 VH-For 和 VH-Rev 引物如下进行 PCR 克隆 VH 基因，利用 Vκ-For 和 Vκ-Rev-mix（将 Vκ1, Vκ2, Vκ4, Vκ5 以 1:1:1:1 混合作为 Vκ-Rev-mix）引物进行 PCR 克隆 Vκ基因。PCR 反应程序为：94℃预变性 2min，继以 94℃变性 30s，55℃退火 30s，72℃延伸 45s，共 35 个循环。取 5μl PCR 产物在 1.5%的琼脂糖凝胶中电泳观察。

1.2.5 scFv 噬菌体文库的构建

将克隆的 VH 和 Vκ基因切胶回收，与合成的 linker 序列按试剂盒方法进行无缝连接得到 scFv 序列。连接完成后，以接产物为模板，VH-For 和 Vκ-Rev-mix 为引物扩增 scFv 片段，切胶回收。Not Ⅰ 和 Sfi Ⅰ 酶切 scFv 序列和 pCANTAB5e 质粒，用 T_4 DNA 连接酶连接，获得重组质粒（图 1）。将获得的重组质粒通过电穿孔的方法转入 TG1 细菌中，用 2×YT 培养液做梯度倍比稀释，涂布 SOB-AG 平板，30℃培养过夜。计数平板上的单菌落数，计算库容。剩余的转化后培养的菌液，加入 80%终浓度灭菌甘油，-80℃冻存，此即为初级抗体库。随机挑取 SOB-AG 平板上单克隆 15 个，提取质粒 DNA，以 VH-For 和 Vκ-Rev-mix 为引物 PCR 扩增 scFv 基因，初步鉴定阳性克隆。

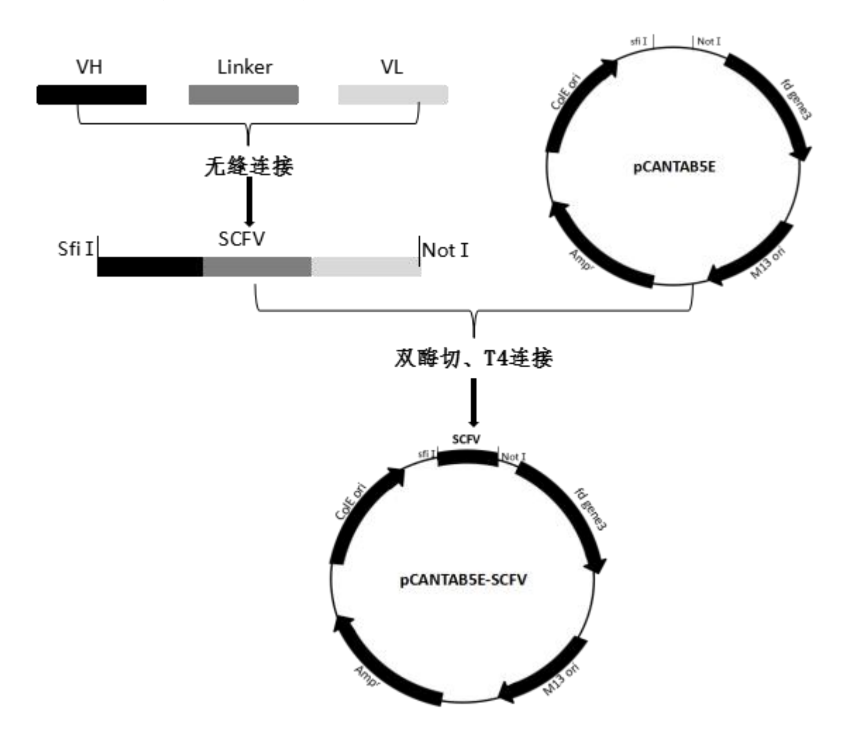


图 1.scFv 噬菌体载体的构建示意图

Fig.1 Construction of scFv phagemid vector

1.2.6 scFv 噬菌体展示文库的筛选

用 M13K07 感染初级抗体库，培养感染细菌，离心取上清收集获得重组噬菌体抗体。

抗原包被过夜，将获得的噬菌体抗体上清按照 MPBS（2%脱脂乳 PBS）：上清=2:3 的比例将 MPBS 和噬菌体上清干扰化处理 20min，加入封闭好的免疫管中，轻摇温育 30 min 后，再静置温育 1.5h，用 0.2N 甘氨酸-Hcl pH2.5 进行洗脱，加入等体积 Tris-Hcl pH7.4 中和洗脱液。后加入宿主菌 TG1（OD_{600}=0.5），振荡培养 1h，加入 4×10^{10}M13K07 噬菌体，静置温育 30 min 后，再振荡培养 30 min，离心后用 2×YT-AK 轻悬细胞沉淀，30℃培养过夜，刮取菌落，重新扩增表达制备噬菌体抗体再进行下一轮的筛选，同样方法筛选至少 3 轮。

1.2.7 scFv 噬菌体文库的初步鉴定

随机挑取 96 个最终获得的抗体库单克隆菌落培养过夜，以 1：100 比例稀释至新鲜含有 2.5×10^{10} pfu/ml M13K07 的 2×YT-AG 中，37℃振荡培养 2h，离心弃上清，沉淀用 2×YT-AK 培养液重悬，37℃培养过夜。离心取上清即重组抗体待用。

包被原过夜，设立阳性对照和阴性对照，阳性对照为 M13K07。一抗为提前混匀的重组抗体（160μl 重组抗体+40μl MPBS），阴性对照加等量的封闭液，37 ℃结合反应 2h。二抗为酶标抗 M13 抗体，37 ℃孵育反应 1h，TMB 显色，加入终止液，置于酶标仪检测波长 450nm 处读取吸光值。

1.2.8 构建真核表达载体 Epxi-CHO 表达

将从噬菌体文库筛选出与抗原结合能力最强的单克隆序列构建入 pcDNA3.4 真核表达载体。提取表达质粒，酶切鉴定后通过瞬时转染方法转染 Epxi-CHO 细胞，转染后 1d 加入增强剂和补料，转染后 7d 收取培养基，收集上清进行 western blot 鉴定单链抗体的表达。

1.2.9 Western blot

将 Epxi-CHO 细胞表达上清进行 SDS-PAGE 电泳并电转移至 PVDF，用 5% 脱脂奶粉室温封闭 1 h，洗涤后，再用 1：10000 稀释 Alexa Fluor™ 680 donkey anti-mouse IgG（H+L）室温孵育 1h 后显色。

2 结果

2.1 克隆 VH 和 Vκ基因

取免疫血清效价在 1：10000 以上的 3 只小鼠，脱颈处死，取脾脏，提取总 RNA，反转录为 cDNA 后，PCR 扩增 VH 和 Vκ基因。获得大小分别约为 390bp 和 350bp 的 VH 和 Vκ基因（图 2），与实验设计一致。

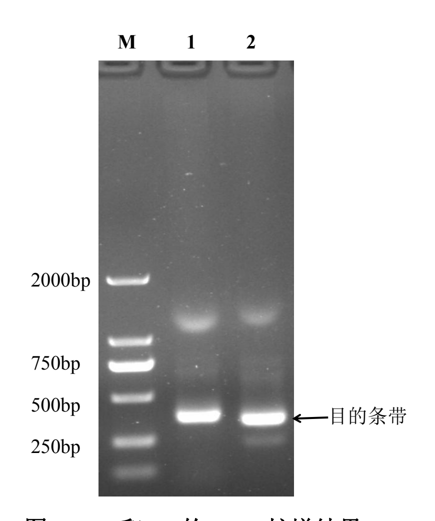


图 2. VH 和 Vκ的 PCR 扩增结果

Fig.2PCR amplification of VH & Vκ gene

M:DL2000 maker; 1:PCR product of VH; 2:PCR product of Vκ

2.2 scFv 基因的连接和扩增

将纯化后的 VH、Vκ和 linker 混合无缝连接后，PCR 扩增获得大量 scFv 条带（图 3），大小约为 780bp。

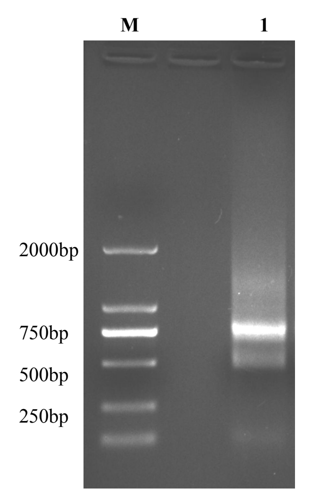


图 3. scFv 基因 PCR 扩增结果

Fig.3 PCR amplification of scFv gene

M:DL2000 maker; 1:PCR product of scFv

2.3 噬菌体文库的构建

将 ScFv 与 pCANTAB5e 质粒酶切连接，电转入制备好的感受态 TG1 细菌中，涂布于 2×YT-AG 平板，计数抗体库容量为 1.2×10^{7}cfu/ml。随机挑取 SOB-AG 平板上单克隆 15 个，提取质粒 DNA，PCR 扩增 scFv 基因，鉴定 15 个克隆均为阳性克隆，重组率达到 100%（图 4）。

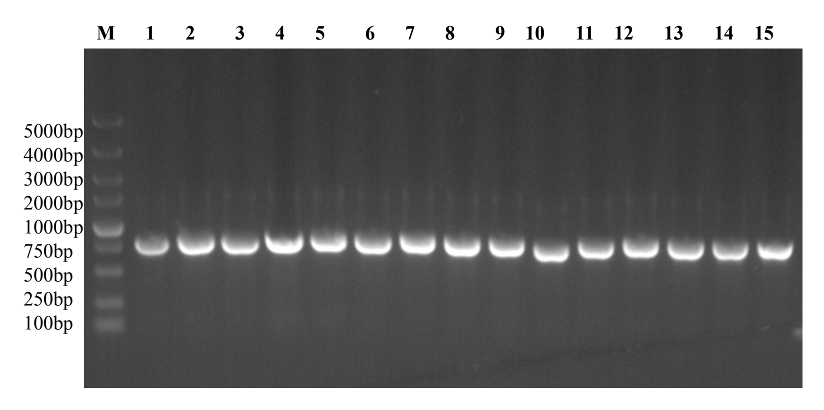


图 4. 单克隆的 PCR 鉴定结果

Fig.4 Identification of individual recombinant clones by PCR

M:DL5000 maker; 1~15: individual recombinant clones

2.4 scFv 噬菌体文库的富集筛选

对噬菌体 scFv 抗体文库进行 4 轮富集筛选，每轮对洗脱下来的噬菌体颗粒进行了滴度测定，取振荡培养的菌液，用 2×YT 培养基做梯度倍比稀释，取稀释液涂布 SOBAG 平板，30 ℃培养过夜，计算菌落形成单位(cfu)，即为淘筛步骤的噬菌体量，计算输出率（输出/输入）。结果显示最后两轮筛选输出率均有上升，较之前有显著的提高，说明噬菌体文库得到了富集(表 1)。

表 1 对特异性噬菌体抗体文库的富集筛选

Table 1 Enrichment of phage antibody library by panning

Rounds of panning	Input phage（CFU）	Output phage（CFU）	Recovery rating
1	3×10^{12}	1.2×10^{6}	4×10^{-7}
2	2.5×10^{12}	3.5×10^{5}	1.4×10^{-7}
3	0.7×10^{12}	1.2×10^{5}	1.7×10^{-7}
4	10×10^{12}	7.5×10^{6}	7.5×10^{-7}

2.5 特异性噬菌体抗体的 ELISA 鉴定

通过 phage ELISA 最终筛选出 8 个与抗原有结合活性的阳性克隆（图 4），且与阴性没有结合活性，送检测序。

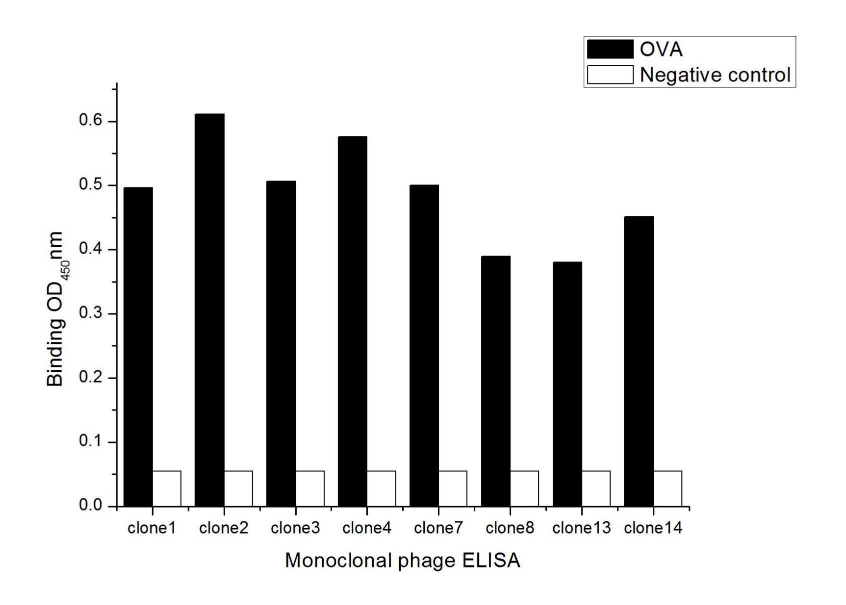


图 5.ELISA 筛选特异性噬菌体抗体

Fig.5 ELISA Selection of phage antibodies specific

利用 Igblasti 数据库对筛选获得的阳性克隆可变区基因序列进行比对，发现其轻链可变区分别属于 VκⅥ、VκⅠ亚群，而重链可变区则属于 VHⅠ亚群。选取 Phage ELISA 中检测到结合能力最高的 2 号克隆构建入真核表达载体 pcDNA3.4 中，在 CHO 细胞中瞬时表达。

2.6 筛选抗体在 Epxi-CHO 细胞中的表达及 western blot 鉴定

结果显示表达载体细胞上清检测到 30kD 左右的目的条带，而空载体细胞上清没有检测到条带（图 6），表明构建的分泌性单链抗体载体成功进行了真核表达。

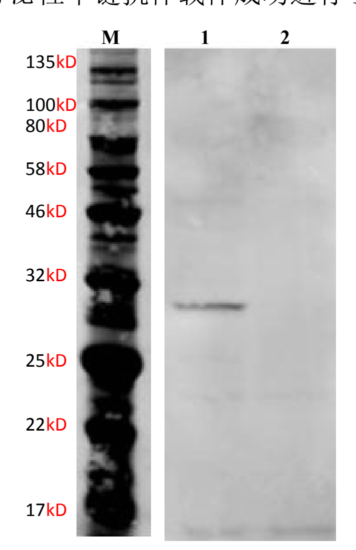


图 6.Western blot

Fig.6 Western blot

1：Transfection of cell supernatant；2：Unloaded somatic supernatant

3 讨论

噬菌体展示技术是目前在改造和筛选功能性多肽或蛋白质方面应用最广泛的技术方法之一[9,11]。该技术的优点是能够将表型和基因型、噬菌体的可扩展性与分子的结合活性直接联系起来。与单克隆抗体制备其它技术相比该方法简单、快速、高效，不需要杂交瘤以及复杂的基因工程技术，展示的拷贝数高，更能筛选到高亲和力和特异性的抗体，抗体的筛选范围非常广，采用不同的抗原进行筛选，可同时获得不同的抗体[12]。

本研究从 OVA 免疫的小鼠中获得了抗体可变区 VH 和 Vκ的基因片段，将其与 Linker DNA 进行无缝连接，一步获得 scFv 片段。相比传统的直接将重链可变区和轻链可变区分别建库进行表达筛选获得库容量更大，也省去了复杂的重叠延伸 PCR(OE-PCR, overlap extension PCR) 过程，无需设计 OE-PCR 引物，只需在扩增抗体可变区的引物和合成的 Linker 上设计一段同源臂便可直接将 VH、Vκ和 Linker 无缝连接为 ScFv 片段，大大的提高了建库的效率。

由于小鼠轻链可变区 95%以上为κ轻链，仅有 5%为λ轻链，本研究只扩增了κ轻链，构建了 VH-Vκ单链抗体文库。本研究共筛选得到 8 个与 OVA 结合的阳性克隆，并将其中的 2 号克隆成功构建入真核表达载体中，在 Epxi-CHO 悬浮细胞中表达得到了可溶性 scFv 抗体。

通过 WB 的方法鉴定可溶性 scFv 抗体成功进行了真核表达。但由于本试验中使用的二抗为抗鼠 IgG 抗体，其免疫原为鼠的全部重链和轻链，其中能与鼠 scFv 结合的部分较少，因此 WB 的结果显示的目的条带较淡。

OVA 蛋白是鸡卵白蛋白，其主要成分为卵清蛋白，属于大分子蛋白，是检测流感疫苗接种反应的重要指标，也是鸡过敏原的一个检测指标，其微量水平即可引起过敏反应。目前检测卵清蛋白含量的主要方法酶联免疫测定法，《中国药典》三部（2005 版）中更是将该方法做为仲裁纳入了药典[13]。但目前不管是检测流感疫苗中还是鸡类食品中的卵清蛋白 ELISA 试剂盒都是依赖进口，价格昂贵，为与节约生产成本同时国际接轨，卵清蛋白单克隆抗体的研究极其重要。本研究获得了卵清蛋白的单链抗体并进行了真核表达，为今后国内卵清蛋白 ELISA 试剂盒的研发奠定了基础。

参考文献

[1] Nieri P, Donadio E, Rossi S, et al. Antibodies for therapeutic uses and the evolution of biotechniques[J]. Current Medicinal Chemistry, 2009, 16(6):753-779.

[2] 马颖, 邹全明. 单链抗体及其在生物医学中的应用[J]. 免疫学杂志, 2006, 22(s1):1-5.
Ma Y ,Single chain antibody and its application in biomedicine[J].Immunological Journal,2006, 22(s1):1-5.

[3] Pande J, Szewczyk M M, Grover A K. Phage display: concept, innovations, applications and future.[J]. Biotechnology Advances, 2010, 28(6):849-858.

[4] Wu C H, Liu I J, Lu R M, et al. Advancement and applications of peptide phage display technology in biomedical science[J]. Journal of Biomedical Science, 2016, 23(1):1-14.

[5] Dudak F C, Boyaci I H, Orner B P. The discovery of small-molecule mimicking peptides through phage display[J]. Molecules, 2011, 16(1):774-789.

[6] Chan C E, Lim A P, Macary P A, et al. The role of phage display in therapeutic antibody discovery.[J]. International Immunology, 2014, 26(12):649-657.

[7] 佟平，高金燕，陈红兵. 鸡蛋清中主要过敏原的研究进展[J]. 食品科学，2007, 28(8):565-568.

Tong P, Gao J Y, Chen H B.Research Progress of Major Egg White Allergens[J]. Food Science, 2007, 28(8):565-568.

[8] Huntington J A, Stein P E. Structure and properties of ovalbumin[J]. Journal of Chromatography B Biomedical Sciences & Applications, 2001, 756(1–2):189-198.

[9] Thie H, Meyer T, Schirrmann T, et al. Phage display derived therapeutic antibodies[J]. Current Pharmaceutical Biotechnology, 2008, 9(6):439-46.

[10] Hoogenboom H R. Selecting and screening recombinant antibody libraries.[J]. Nature Biotechnology, 2005, 23(9):1105-1116.

[11] Löfblom J. Bacterial display in combinatorial protein engineering.[J]. Biotechnology Journal, 2011, 6(9):1115–1129.

[12] Bellofiore P, Petronzelli F, Martino T D, et al. Identification and refinement of a peptide affinity ligand with unique specificity for a monoclonal anti-tenascin-C antibody by screening of a phage display library[J]. Journal of Chromatography A, 2006, 1107(1–2):182-191.

[13] Jefferson T, Smith S, Demicheli V, et al. Assessment of the Efficacy and Effectiveness of influenza Vaccines in Healthy Children:Abstract of Systematic Review[J]. Chinese Journal of Evidence-Based Medicine, 2005, 365(9461):773-780.